

文章编号: 1674 - 5566(2015)04 - 0513 - 10

水葫芦栽培对池塘浮游细菌群落结构影响初探

范立民^{1,2}, 陈家长^{1,2}, 吴伟², 孟顺龙^{1,2}, 宋超², 胡庚东², 裘丽萍², 瞿建宏², 徐跑^{1,2}

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部长江下游渔业资源环境科学观测实验站, 江苏 无锡 214081)

摘要: 应用高通量测序技术研究了浮床栽培水葫芦对罗非鱼养殖池塘中浮游细菌群落结构的影响, 对水葫芦种植区和敞水区间细菌群落组成、多样性和丰富度的差别进行了分析, 通过对主要环境因子与群落多样性和丰富度之间关系的分析, 探讨了水葫芦栽培对浮游细菌影响的部分可能机理。结果表明: 水葫芦栽培池塘中蓝细菌门、放线菌门和变形菌门是优势菌群; 与敞水区相比, 水葫芦种植区蓝细菌门的相对丰度较高, 其他一些门类的相对丰度较低, 细菌群落多样性和丰富度较低; 主要环境因子中叶绿素 a 和亚硝酸盐氮与细菌群落多样性和丰富度呈负相关的现象, 可能与水葫芦浮床栽培对藻类丰度和亚硝酸盐氮浓度的影响有关。

研究亮点: 浮床栽培水葫芦对养殖池塘浮游细菌群落的影响研究未见报道。本研究采用高通量测序技术, 在相对较高的检测分辨率下初步探索浮床栽培水葫芦对养殖池塘浮游细菌群落的影响, 为相关研究提供基础数据, 为水葫芦的进一步应用提供参考。

关键词: 高通量测序; 罗非鱼; 精养池塘; 浮游细菌; 水葫芦

中图分类号: S 917. 1

文献标志码: A

水葫芦 (*Eichhornia crassipes*) 又名凤眼莲, 原产于南美洲, 是雨久花科多年生水生植物。1901 年作为花卉引入我国^[1], 之后在长江流域及其以南地区呈泛滥之势^[2], 因此, 很多学者都在研究水葫芦资源化利用的可能。当前, 水质净化方面水葫芦已成为生态修复工程中应用较广的水生植物^[3]。到目前为止, 在太湖^[4]、滇池^[5]等水体中进行的规模化种植水葫芦来净化水质已经取得了一些成果。本实验室近年来也在进行利用水葫芦净化水产养殖水体的研究, 结果表明其在营养物质移除方面具有较好的效果。然而, 对于水产养殖系统而言, 作为一种外源性的生物植入, 水葫芦的种植势必对水体的生物群落结构造成影响, 了解这样的影响有利于从生物多样性的角度来判断水葫芦是否适合在养殖池塘中进行栽培, 也可以进一步丰富人们对于浮床植物影响

水体浮游细菌群落结构的认识。

已有研究表明, 水葫芦根际分泌物可以通过使藻类叶绿素 a 破坏、光合作用速率降低等方式产生克藻效应^[6], 从而可以影响在水产养殖系统中具有重要作用的藻类的群落结构; 对于金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、枯草杆菌和假单胞菌等异养菌的影响实验表明^[7], 水葫芦根际分泌物对几种细菌的影响不一, 既可能是抑菌作用(金黄色葡萄球菌), 也可能是增殖作用(藤黄八叠球菌)或不产生任何影响(枯草杆菌和假单胞菌)。由此可见, 水葫芦种植对于整个细菌群落的影响可能会因种植之前水体细菌群落的不同而不同; 而在富营养化湖泊水体种养水葫芦实验的研究结果表明^[8], 水葫芦种植区可以提高水体可培养细菌的多样性, 改变细菌群落结构。到目前为止, 水葫芦种植对水产养殖水体细菌群落结构影

收稿日期: 2014-12-31 修回日期: 2015-02-16

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2013JBFM04); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49)

作者简介: 范立民(1978—), 男, 博士研究生, 研究方向为渔业生态环境保护。E-mail: fanlm@ffrc.cn

通信作者: 徐跑, E-mail: xup@ffrc.cn

响的研究还未见报道。

高通量测序技术相对于传统测序技术来讲,是里程碑式的进步^[9],主要表现在其极大地加快了测序速度,并且显著降低了测序成本。对于微生物群落多样性研究来说,PCR-DGGE^[10]、PCR-TGGE^[11]、PCR-SSCP^[12]、PCR-RFLP^[13]、PCR-ARDRA^[14]等分子生物学技术相对于传统的基于培养的方法已经表现出明显的优势,但和高通量测序技术相比,这些技术对环境微生物信息的发掘还不够全面^[15],主要表现在对多态性检测的分辨率上,高通量测序技术能够得到更多的操作分类单元(OTU)。本文希望采用高通量测序技术,在更高的检测分辨率下研究水葫芦净化池塘的细菌群落结构,以期对相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

矩形试验池塘位于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南区,约 60 m 长(东北-西南方向),35 m 宽(西北-东南方向),初始水深约 1.5 m,采样时水深约为 2 m 左右。2013 年 5 月 8 日投放平均体重约为 100 g 的吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼种约 3 500 尾。每天投喂一次(15:30 左右)。2013 年 6 月 7 日,10~15 cm 高的水葫芦苗种到 70 个 2 m 长、1.5 m 宽的矩形浮床中,每个浮床内水葫芦苗漂浮面积占浮床面积 10% 左右。浮床框架为直径 50 mm 的 PVC 管,孔径为 2 mm×2 mm 的尼龙网系到 PVC 管上形成网兜状,水葫芦苗漂浮于其中。至采样时,每个浮床内的水葫芦几乎占满整个浮床。所有浮床组成的矩形种植区域在池塘中的布局如图 1 所示。2013 年 7 月 7 日上午进行水样采集,采样点同样如图 1 所示,于距离种植浮床区边缘 50 cm 处采集 50 cm 深水样,采样点 a1、a2、a3 水样混合为 wp1,采样点 b1、b2、b3 水样混合为 wp2,在与种植区相对应的敞水区设置采样点,采样点位置大致与种植区对称,A1、A2、A3 水样混合为 w1,B1、B2、B3 水样混合为 w2。250 mL 水样经孔径 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤膜放置 2 mL 灭菌离心管后浸于液氮罐中短暂处理,然后放于 -80 °C 超低温冰箱中备用。

1.2 水质测定

采用 DIONEX ICS3000 型离子色谱仪测定水

样中硝酸盐氮($\text{NO}_3\text{-N}$)和亚硝酸盐氮($\text{NO}_2\text{-N}$);纳氏试剂分光光度法测定水样中氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)浓度;总有机碳分析仪(GE SieversInnovOx Laboratory TOC Analyzer)测定水样 TOC 及总碳(TC)、无机碳(IC)浓度;过硫酸钾氧化法测定总磷(TP)和总氮(TN)。

1.3 基因组 DNA 提取及纯化

根据 PowerWater DNA Isolation Kit(MO BIO, 美国)的要求,取出保存备用的滤膜,按照试剂盒说明书提供的操作步骤进行 DNA 的抽提,利用 Mobio PowerClean[®] DNA Clean-Up Kit 进行 DNA 的纯化,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化后的基因组 DNA。

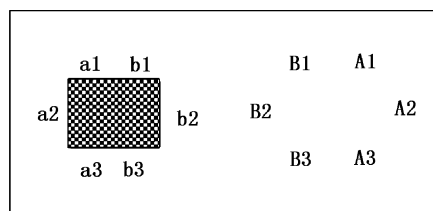


图 1 采样点布设示意图

Fig. 1 Sampling stations in the intensive pond

1.4 PCR 扩增及产物定量和均一化

合成带有 barcode(标签)的特异引物,扩增 16S rRNA 基因 V1~V3 可变区;引物序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',533R: 5'-TTA CCGCGGCTGCTGGCAC-3';采用 ABI GeneAmp[®] 9700 型基因扩增仪进行 PCR 扩增。全部样品按照正式实验条件进行,每个样品 3 个重复,将同一样品的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物,Tris_HCL 洗脱;2% 琼脂糖电泳检测。参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor[™]-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量,之后按照每个样品的测序量要求,进行相应比例的混合。

1.5 PE(Pair-end)文库构建及高通量测序

将产物连接“Y”字形接头,使用磁珠筛选去除接头自连片段,利用 PCR 扩增进行文库模板的富集,采用氢氧化钠变性后得到单链 DNA 片段。应用高通量测序平台 Illumina MiSeq 进行高通量测序,具体过程如下:DNA 片段的一端与引物碱基互补,固定在芯片上;另一端随机与附近的另

外一个引物互补,也被固定住,形成“桥(bridge)”;PCR扩增,产生DNA簇;DNA扩增子线性化成为单链;加入改造过的DNA聚合酶和带有4种荧光标记的dNTP,每次循环只合成一个碱基;用激光扫描反应板表面,读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类;将“荧光基团”和“终止基团”化学切割,恢复3'端粘性,继续聚合第二个核苷酸;统计每轮收集到的荧光信号结果,获知模板DNA片段的序列,以上工作由上海美吉生物医药科技有限公司协助完成。

1.6 数据去杂优化

对测序结果进行详细的生物信息学分析之前先对数据进行去杂优化。根据PE Reads之间的重叠关系,使用Seqprep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)软件将成对的Reads拼接成一条序列。根据标签序列区分各个样品的测序数据。数据去杂方法和参数如下:(1)根据PE reads之间的重叠关系,将成对reads拼接成一条序列,最小重叠长度为15 bp;(2)拼接序列的重叠区允许的最大错配比率为0.02,最小错配率为0.9,筛选不符合序列;(3)检测序列末端box序列,最小错配数为0将起始端包含box的序列进行反向互补,并去除box;(4)检测序列上的标签并区分样品,标签错配数为0,最大引物错配数为2。

1.7 生物信息学分析

采用Qiime (<http://qiime.org>)在相似度97%水平下对优化序列进行OTU (operational taxonomic unit)聚类分析和分类学分析;样品的稀释性曲线分析、菌群丰度指数分析(Chao 1指数 (<http://www.mothur.org/wiki/chao>)和ACE指数 (<http://www.mothur.org/wiki/Ace>))、菌群多样性指数分析(Shannon指数 (<http://www.mothur.org/wiki/Shannon>)和Simpson指数 (<http://www.mothur.org/wiki/Simpson>))均采用Mothur软件。采用Canoco4.5软件环境变量和生物变量间的冗余分析(RDA)。

2 结果与分析

通过对4个样品的高通量测序分析,得到145 525条优化序列(Reads),36 210个OTUs (Operational Taxonomic Units),这些OTUs可以归纳为36个门(phyla)或组(groups)。通过稀释性曲线分析(图2)可以看出,水葫芦种植区水样

和敞水区水样具有明显的差别,前者的曲线更趋向于平坦,表明对敞水区来说测序深度还可以更深。

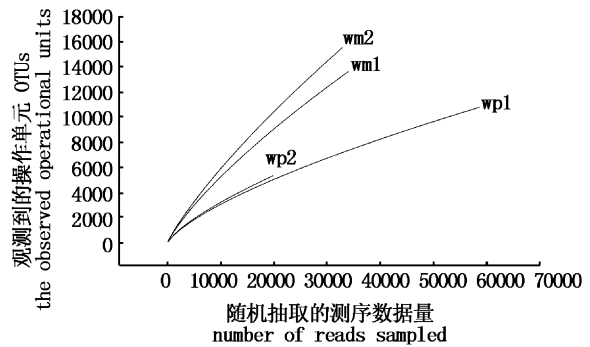


图2 相似度97%时的稀释性曲线图

Fig. 2 Rarefaction curves of OTUs clustered at 97% sequence identity across different area of the pond

2.1 群落组成

通过对“门”水平的群落组成进行分析,表明蓝细菌门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿菌门(Chlorobi)浮霉菌门(Planctomycetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)是水葫芦栽培池塘主要的浮游细菌组成(图3)。其中蓝细菌门处于绝对优势地位,其次是变形菌门和放线菌门。同时敞水区水样(图3a、b)和水葫芦种植区水样(图3c、d)的细菌群落组成在门水平上有变化,主要表现在水葫芦种植区水样蓝细菌门的相对丰度增加而绝大多数其他门类的相对丰度下降,敞水区水样蓝细菌平均相对丰度为49.6%,而水葫芦种植区蓝细菌的平均相对丰度为79.9%;变形菌门和放线菌门在所有样品中的相对丰度仅低于蓝细菌门,两者的平均丰度分别从敞水区水样中的20.1%和11.8%下降到水葫芦种植区的9.1%和3.8%。表明水葫芦种植区水葫芦的存在使得该水域中细菌群落更倾向于以蓝细菌为主。

在“纲”水平继续分析敞水区和水葫芦种植区的细菌群落组成,结果表明(图4),蓝细菌门中的主要组成是蓝细菌纲,其在水葫芦种植区水样和敞水区水样中的平均相对丰度分别为47.5%和78.6%;变形菌门中主要由 α 变形菌纲、 β 变形菌纲、 γ 变形菌纲和 δ 变形菌纲组成,四者在敞水区水样和水葫芦种植区水样中的总平均相对丰度分别为18.95%和8.97%,分别占变形菌门

的 94.3% 和 76.0%。但是在敞水区和水葫芦种植区水样间这 4 者的相对比例存在着较显著的差异,在敞水区以 β 变形菌纲为主 (α 变形菌纲、 β 变形菌纲、 γ 变形菌纲和 δ 变形菌纲的平均相对丰度分别为 4.11%、10.75%、2.69% 和 1.40%),在水葫芦种植区则 γ 变形菌纲的相对丰

度显著增加(相对应四者的平均相对丰度分别为 1.58%、2.92%、3.93% 和 0.54%);放线菌门中的主要组成是放线菌纲,其在敞水区和水葫芦种植区水样中的平均相对丰度分别为 8.42% 和 2.84%,分别占放线菌门的 71.4% 和 74.7%。

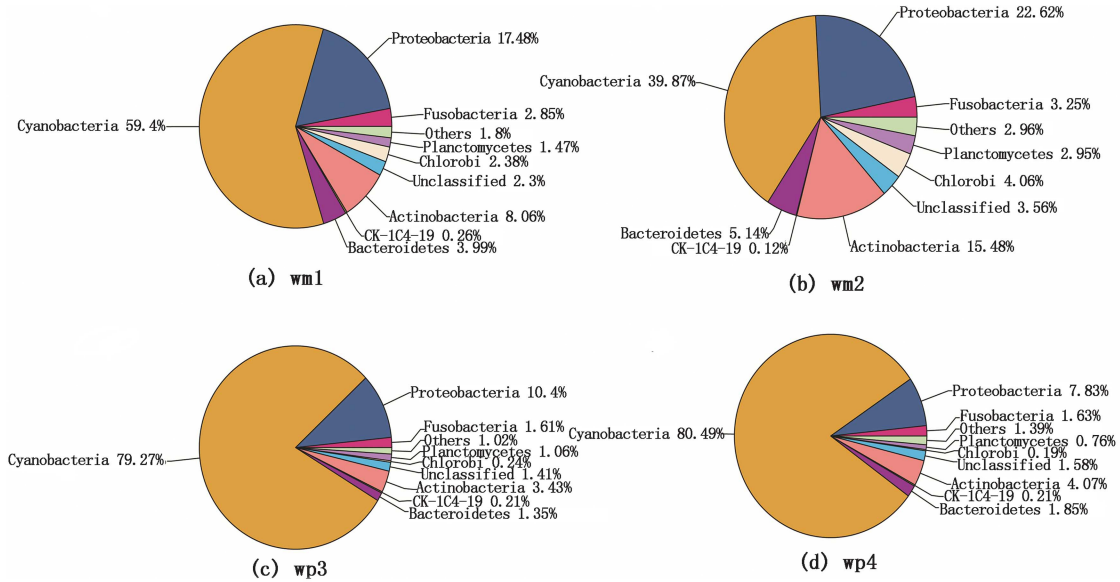


图 3 池塘中浮游细菌的群落组成

Fig. 3 Bacterial compositions of the different communities

图 6 中红色显示了一些“属”在敞水区和水葫芦种植区水样之间丰度差别也比较大,聚球藻属 (*Synechococcus*)、蓝细菌属 (*Cyanobacterium*)、泛菌属 (*Pantoea*)、海氏菌属 (*Hirschia*)、*Massilia*、*Crocinitomix*、玫瑰螺菌属 (*Roseospirillum*)、*Filimonas* 在敞水区水样中的丰度高于水葫芦种植区,水栖菌属 (*Enhydrobacter*) 和不动菌属 (*Acinetobacter*) 在水葫芦种植区水样中的相对丰度高于敞水区水样。

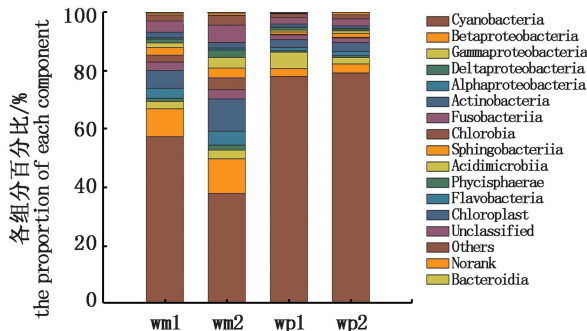


图 4 “纲”水平群落组成柱状图

Fig. 4 Microbial community barplot in class level

2.2 群落分布及多样性、丰富度差别

为了进一步研究敞水区和水葫芦种植区水中细菌群落的分布情况,笔者对敞水区水样和水葫芦种植区水样共有 OTUs 和 Reads 进行分析,结果如表 1 所示,蓝细菌门 (*Cyanobacteria*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿菌门 (*Chlorobi*) 浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 和梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 7 个门中的共有 OTUs (占有所有共有 OTUs 95.4%) 占总 OTUs (36210) 的比例仅为 9.68%,然而,这部分共有 OTUs 所对应的相对丰度却分别占敞水区水样 (wm) 和水葫芦种植区水样 (wp) 的 51.34% 和 75.37%,表明敞水区和水葫芦种植区水样中差异性细菌群落具有更大的多样性,而这些共有 OTUs 在水葫芦种植区占有更大相对丰度的现象可能预示着水葫芦种植区细菌群落多样性下降的事实。具体到各自的门类,小的共有 OTUs 比重对应更大的相对丰度的顺序 (OR/AR) 分别是敞水区:绿菌门 (*Chlorobi*)、浮霉菌门

(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteria);水葫芦种植区:绿菌门(Chlorobi)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteria)。表明敞水区和水葫芦种植区水样中差异性细菌群落具有更大的多

样性的现象在绿菌门(Chlorobi)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)中更为突出。其中,敞水区水样和水葫芦种植区水样相比,这一比例在变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)中产生了较大的变化,均是敞水区高于水葫芦种植区。表明水葫芦种植使得变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)中细菌群落多样性可能均发生了显著的变化。

表 1 主要细菌门类中共有 OTUs 和共有 Reads 比例

Tab.1 The ratios of the common OTUs and reads to their total in seven main phyla %

类别 taxa	共有 OTUs 占该门类总 OTUs 的比重 ratios of the common OTUs to their total(OR)	共有 Reads 占对应水样中该门类总 Reads 的比重(AR) ratios of the common reads to their total	
		wm	wp
Cyanobacteria	15.55	65.59	82.99
Proteobacteria	6.32	32.39	45.68
Actinobacteria	11.19	50.91	64.88
Fusobacteria	13.69	54.88	65.54
Bacteroidetes	6.28	31.27	45.00
Planctomycetes	9.69	54.79	67.61
Chlorobi	6.62	60.22	72.47

通过对样品多样性(Shannon 指数、Simpson 指数)、丰富度指数(Ace 指数和 Chao 指数)的研究显示(表 2),与敞水区相比,水葫芦种植区的 Shannon 指数下降,Simpson 指数上升,表明水葫芦种植区的菌群多样性低于敞水区;同样水葫芦种植区的 Ace 指数和 Chao 指数显著低于敞水

区,表明该区域菌群丰富度指数显著低于敞水区;另外,比较这次测序所得到的 Reads 和 OTUs 同样表明,敞水区水样得到了更多的 Reads 和 OTUs,可能从另一方面佐证两个区域菌群多样性、丰富度的差别。

表 2 样品多样性和丰度指数

Tab.2 Richness and diversity statistics of the samples

样品名 samples	Reads	OTUs	相似度 97% 下的多样性及丰富度指数 values of richness and diversity index under the similarity of 97%			
			Ace	Chao	Shannon	Simpson
wm1	34031	13598	105995 (103687,108281)	50747 (48409,53241)	8.03 (8,8.05)	0.0073 (0.0069,0.0077)
wm2	32934	15507	136273 (133384,139233)	65000 (62031,68158)	8.44 (8.41,8.46)	0.0032 (0.003,0.0034)
wp1	58671	10760	64520 (63043,66039)	33603 (31997,35330)	5.65 (5.62,5.68)	0.1386 (0.1357,0.1414)
wp2	19889	5324	39964 (38696,41279)	19318 (17916,20877)	5.64 (5.59,5.69)	0.1285 (0.1238,0.1332)

所有群落组成及分布、丰富度及多样性上的差别又可以在“属”水平的分层聚类热图分析中得到进一步的体现(图 6)。图 6 表明,丰度较高的属(图 6 中上部黄色、红色的区域)不仅包括蓝

细菌门中的属[微囊蓝细菌属(*Microcystis*)、聚球菌属(*Synechococcus*)、蓝细菌属(*Cyanobacterium*)、*Cylindrospermopsis*]和变形菌门中的属[气单胞菌属(*Aeromonas*)、多核杆菌属

(*Polynucleobacter*)、球衣细胞属(*Sphaerotilus*)、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、不动菌属(*Acinetobacter*),还包括厚壁菌门(*Firmicutes*)中的属(*Cetobacterium*)]等其他门类。这些在属水平上,甚至在种水平上的组成和丰度差异使得水葫芦种植区水样(wp1和wp2)和敞水区水样(wm1和wm2)被归为两类,这进一步表明了两者多样性、丰富度上的差别。

2.3 主要环境因子与多样性、丰富度指数之间的关系

图5显示了水葫芦净化池塘中氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)、亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)、总磷(TP)、总氮(TN)、叶绿素a(*Chl. a*)、总有机碳(TOC)、总碳(TC)、无机碳(IC)等环境因子与多样性指数(Shannon指数和Simpson指数)和丰富度指数(Chao指数和Ace指数)之间的关系。图5表明水葫芦净化池塘中叶绿素a和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 与水体细菌多样性和丰富度均呈负相关,其他指标与水体细菌多样性和丰富度均呈正相关。其中TN与细菌多样性之间具有更大的相关性, $\text{NO}_3\text{-N}$ 与细菌多样性和丰富度均具有比较大的相关性,TC、TOC、IC和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 与细菌丰富度之间具有更大的相关性。由于Simpson指数值越低所反映的多样性越高,所以其与*Chl. a*和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 呈正相关与Shannon指数与这两个指标呈负相关是对应的。

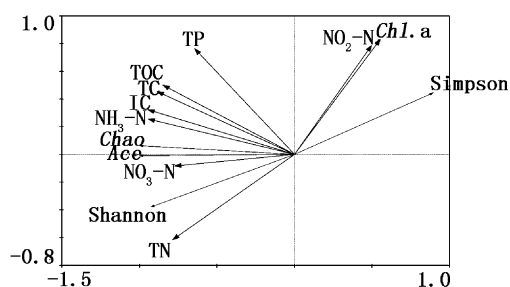


图5 部分环境变量和多样性、丰富度指数间的冗余分析图

Fig. 5 Redundancy analysis of some environmental variables with diversity and abundance index

3 讨论

3.1 罗非鱼养殖池塘的浮游细菌组成

当前,为了解决池塘养殖过程中出现的病害、水产品质量安全和面源污染隐患等问题,很多学者把精力放在池塘微生态环境的认知和调控方法的研究上^[16]。对于池塘水体中细菌群落

的认知是其中重要的一部分,因为池塘中的细菌群落与池塘中营养物质循环、水质状况、养殖生物的健康状况等均具有重要的关系^[17]。

已有研究表明,不同的养殖品种对水体细菌群落组成具有显著的影响。如WU等^[18]的研究表明,草鱼养殖池塘水中居于前两位的优势菌群是变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*);CHENG等^[19]对于中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖池塘水体中细菌群落的研究表明,疣微菌门(*Verrucomicrobia*)为优势菌群;而本研究表明,罗非鱼精养池塘中敞水区最主要的浮游细菌组成是蓝细菌门(*Cyanobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)。罗非鱼精养池塘的细菌群落组成有其自身的特点,这应该与不同养殖品种的生活习性、食性特征、饵料差别等有关。相对于草鱼和中华绒螯蟹来说,吉富罗非鱼投饵量大,残饵和粪便产生量多,由此造成的过多的营养物质输入可能是造成蓝细菌门相对丰度较大的主要原因。本文主要是以罗非鱼养殖池塘为研究对象,研究浮床种植水葫芦对浮游细菌群落结构的影响,因此,其结果是基于池塘罗非鱼养殖这一前提的,在总体上应该表现出了罗非鱼养殖池塘的部分特点(特别是在敞水区)。但是敞水区和种植区间群落结构和多样性的差别表明了浮床种植水葫芦对浮游细菌群落结构和多样性能够产生影响。

3.2 水葫芦种植对浮游细菌群落的影响

通过本次调查发现,水葫芦种植使得种植区附近浮游细菌的群落结构和敞水区间显著不同。首先,水葫芦种植区蓝细菌门(*Cyanobacteria*)的相对丰度上升,这与预期的由于化感作用使得蓝细菌丰度下降的结果是相反的。其他一些浮床试验如采用浮床栽培旱伞草(*Cyperus alternifolius*)^[20-21],由美人蕉和水雍菜组成的复合浮床^[22],由香姑草(*Hydrocotyle vulgaris*)、浮叶植物睡莲(*Nymphaea tetragona*)和沉水植物轮叶狐尾藻(*Myriophyllum verticillatum*)组成的梯级浮床^[23]等表明,浮床栽培这些水生植物可以使得蓝细菌门的种群生物量下降,表明了水葫芦分泌的化感物质对蓝细菌门来说效果可能并不明显,其克藻效应可能对一些真核藻类更有效,亦或是由于在养殖池塘中更容易产生浮床对藻类的吸附与拦截作用^[24],具体还有待进一步研究。

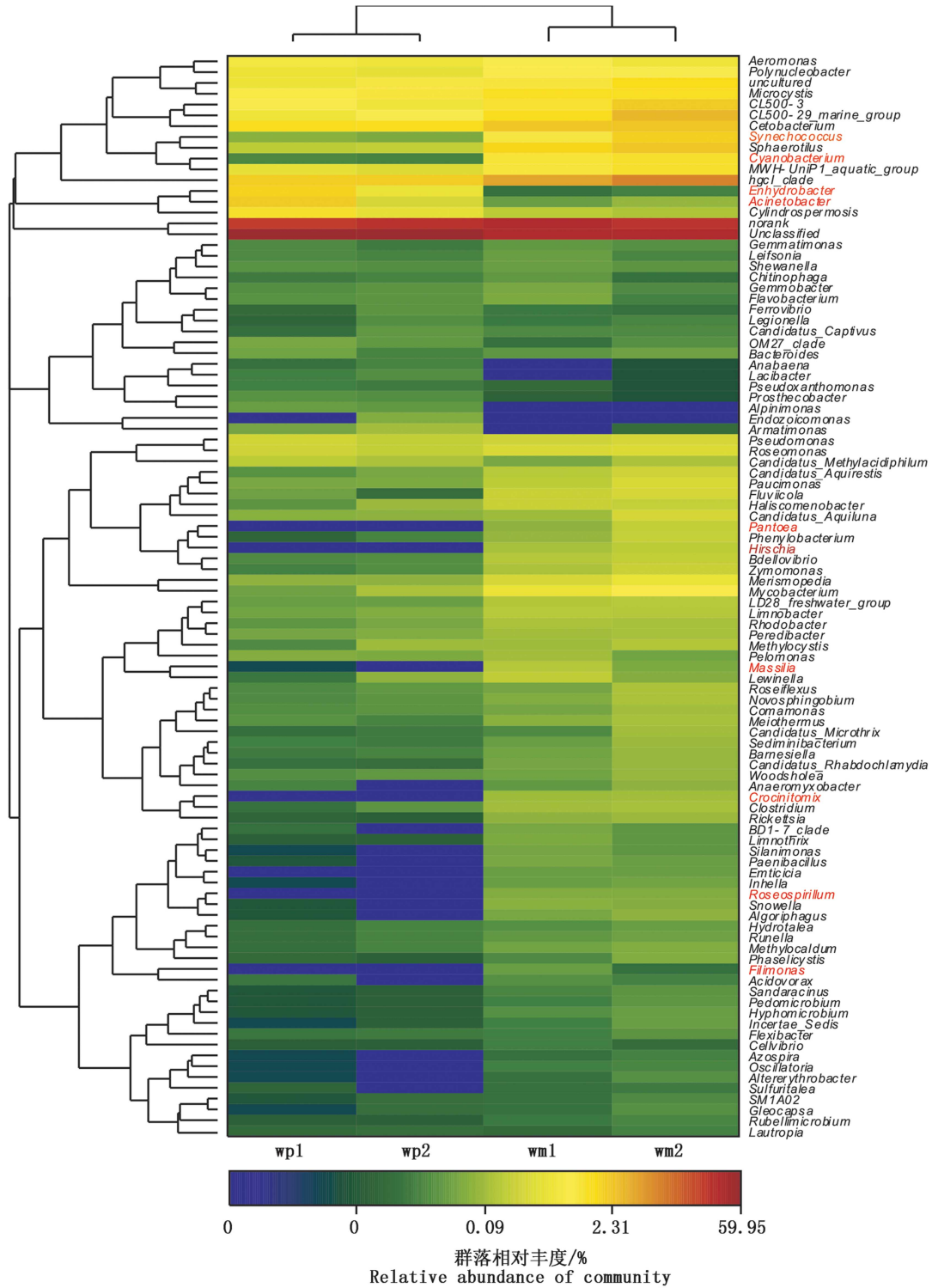


图6 分层聚类热图

Fig.6 Microbial community heatmap analysis

其次,和敞水区相比,水葫芦种植区细菌群落多样性和丰富度都下降。如前所述,水葫芦种植区和敞水区细菌群落多样性的变化在蓝细菌门(Cyanobacteria)并不显著,更大的变化发生在

变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。表明对于敞水区蓝细菌门丰度上升的原因是由于浮床的吸附与拦截作用可能性更大一点。对于多样性和丰富度的变化可能

与蓝细菌及其他藻类在浮床区的聚集有关。总体上来讲,浮床种植水葫芦使得该区域浮游细菌群落多样性下降,蓝细菌聚集,因此,抛开其可以带走水体氮磷等营养物质能力的因素,单从对水体浮游细菌生物多样性的角度来说,水葫芦可能并不是最好的选择。

最后,浮床种植水葫芦对池塘中浮游细菌造成影响机理可能是多方面的,而通过一定程度上对环境因子的改变来施加影响应该是其中的机理之一。基于此,本文对其进行了探讨。但是,由于采样点不多和采样次数的限制,所得到的结果可能只是大体上表明了主要环境因子与细菌群落多样性、丰富度之间的关系,这样的关系中比较明显的趋势应该具有参考意义。其中,环境因子 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 *Chl. a* 与细菌多样性和丰富度呈负相关可能与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和与 *Chl. a* 相关的藻毒素对大量浮游细菌的毒性有关;由于水葫芦的种植使得该区域蓝细菌聚集,蓝细菌的相对丰度上升,因而水体 *Chl. a* 浓度上升,而由于藻体释放的藻毒素等有毒物质对其他浮游细菌的毒性作用,使得该区域浮游细菌多样性下降;对于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 来说,有研究表明,其通常在池塘中与 *Chl. a* 的相关性并不显著^[25],因此,其与细菌多样性之间呈现的关系可能与水葫芦种植所造成的其他一些因素改变有关,具体还有待进一步研究。

3.3 高通量测序研究浮游细菌群落结构的优势

本研究采用了基于 Illumina MiSeq 平台的高通量测序技术来分析浮游细菌的群落结构,得到了 36 210 个操作分类单元 (OTUs),最少的样品中也得到了 19 889 个 OTUs,这是由于高通量测序技术可以检测出丰度极小的一些细菌种类,这一点是许多其他分子生态学技术所办不到的,通过其他手段得到的 OTUs 通常只有几十个^[26-29],因此通过对这些 OTUs 的分析能得到更为丰富的多样性、丰富度信息,同时还能够对一些丰度较小的类别进行分析,如本研究中在“属”水平的分层聚类图中我们可以看到敞水区和水葫芦种植区之间在一些相对丰度较小的属间的一些差异,为我们提供了更为细微的信息。结合先进的生物信息学的分析方法,使得庞大的数据量转化为适用的、更为丰富的微生物信息。

4 结论

(1) 浮床栽培水葫芦的罗非鱼精养池塘水体

中处于优势地位的浮游细菌群落为蓝细菌门、放线菌门和变形菌门。(2) 水葫芦种植使得养殖池塘水体中浮游细菌群落的空间分布产生变化。种植区蓝细菌门的相对丰度增加,绝大多数的其他门类相对丰度下降;表现在群落多样性和丰富度上面,种植区浮游细菌群落多样性和丰富度均下降;在所有门类中,水葫芦种植使得变形菌门和拟杆菌门的多样性变化最大。(3) 从生物多样性的角度来说,池塘种植水葫芦可能不是好的选择。(4) 浮床栽培水葫芦的罗非鱼精养池塘水体中, $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 *Chl. a* 与浮游细菌群落多样性和丰富度呈负相关关系。

参考文献:

- [1] 谭承建,董强,王银朝,等. 水葫芦的危害、利用与防除[J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 55-58.
TAN C J, DONG Q, WANG Y C, et al. The Harmfulness, exploitation and treating measurement of water hyacinth[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(3): 55-58.
- [2] 汪凤娣. 外来入侵物种凤眼莲的危害及防治对策[J]. 黑龙江环境通报, 2003, 27(3): 21-23.
WANG F D. The Harmfulness and prevention countermeasure of invasive alien species *Eichhornia crassipes* [J]. Heilongjiang Environmental Journal, 2003, 27(3): 21-23.
- [3] 张宪中,孙梅,张维娜,等. 2种水葫芦-微生物系统水质净化效果的比较[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(8): 4645-4648.
ZHANG X Z, SUN M, ZHANG W N, et al. Comparison of the water purification effect of two kinds of water hyacinth-on microbial system [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(8): 4645-4648.
- [4] 刘国锋,张志勇,严少华,等. 大水面放水葫芦对太湖竺山湖水环境净化效果的影响[J]. 环境科学, 2011, 32(5): 1299-1305.
LIU G F, ZHANG Z Y, YAN S H, et al. Purification effects of large-area planting water hyacinth on water environment of Zhushan Bay, lake Taihu [J]. Environmental Science, 2011, 32(5): 1299-1305.
- [5] 张霞,蔡宗寿,陈丽红,等. 滇池水葫芦规模化控养生态环境效应分析[J]. 环境工程, 2013, 31(s1): 288-291.
ZHANG X, CAI Z S, CHEN L H, et al. Ecological and environmental effects analysis of large-scale controlled planting of water hyacinth in the Dianchi Lake [J]. Environmental Engineering, 2013, 31(s1): 288-291.
- [6] 孙文浩,俞子文,余叔文. 水葫芦对藻类的克制效应[J]. 植物生理学报, 1988, 14(3): 294-300.
SUN W H, YU Z W, YU S W. Inhibitory effect of *Eichhornia Crassipes* (Mart.) solms on algae [J]. Acta

- Phytophysiological Sinica, 1988, 14(3): 294-300.
- [7] 郑师章,何敏.水葫芦根分泌物对若干细菌作用的研究[J].生态学杂志,1990,9(5):58-59.
ZHENG S Z, HE M. Effect of root secretion of water-hyacinth on several bacteria[J]. Chinese Journal of Ecology, 1990, 9(5): 58-59.
- [8] 郑有坤,刘凯,熊子君,等.大水面放养水葫芦对富营养化湖泊水体可培养细菌群落结构的影响[J].微生物学通报,2015,42(1):42-53.
ZHENG Y K, LIU K, XIONG Z J, et al. Effect of large-scale planting water hyacinth on cultivable bacterial community structure in the eutrophic lake[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 42-53.
- [9] 王兴春,杨致荣,王敏,等.高通量测序技术及其应用[J].中国生物工程杂志,2012,31(1):109-114.
WANG X C, YANG Z R, WANG M, et al. High-throughput sequencing technology and its application [J]. China Biotechnology, 2012, 31(1): 109-114.
- [10] 杨彩霞,王崇明,李赞,等.应用DGGE技术分析流清河湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化[J].水产学报,2012,36(3):407-414.
YANG C X, WANG C M, LI Y, et al. Seasonal changes of bacterial community composition in the scallop culture area of Liuqinghe Bay studied by PCR-DGGE [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 407-414.
- [11] 张伟,李闻,张伟尉,等.采用温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析消毒剂对池塘型微宇宙细菌群落结构的影响[J].应用与环境生物学报,2008,14(1):90-93.
ZHANG W, LI W, ZHANG W W, et al. Effect of disinfectant on bacterial community structure of pond microcosm: a temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) analysis[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(1): 90-93.
- [12] 路盼盼,李建辉,张亚平.新疆泥火山细菌群落PCR-SSCP分析[J].微生物学通报,2011,38(2):195-198.
LU P P, LI J H, ZHANG Y P. PCR-SSCP Analysis bacterial community of mud volcano in Xinjiang [J]. Microbiology China, 2011, 38(2): 195-198.
- [13] 汤祥明,高光,秦伯强.太湖有机聚集体上附着细菌群落结构与动态的T-RFLP分析[J].生态科学,2008,27(5):341-345.
TANG X M, GAO G, QIN B Q. Organic aggregate-attached bacterial community composition and dynamics of the shallow hypertrophic freshwater lake Taihu, revealed by T-RFLP analysis[J]. Ecological Science, 2008, 27(5): 341-345.
- [14] 夏月, KHAN S, 贺纪正, 等. 限制性片段长度多态性分析(ARDRA)方法对重金属污染土壤中细菌群落多样性的研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 953-960.
XIA Y, KHAN S, HE J Z, et al. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis to study microbial diversity in soils impacted by heavy metals [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(6): 953-960.
- [15] 王绍祥,杨洲祥,孙真,等.高通量测序技术在水环境微生物群落多样性中的应用[J].化学通报,2014,77(3):196-203.
WANG S Y, YANG Z X, SUN Z, et al. Application of high throughput sequencing in the diversity of water microbial communities[J]. Chemistry, 2014, 77(3): 196-203.
- [16] 范立民,徐跑,吴伟,等.淡水养殖池塘微生态环境调控研究综述[J].生态学杂志,2013,32(11):3094-3100.
FAN L M, XU P, WU W, et al. Regulation of micro-ecological environment in freshwater aquaculture pond: a review[J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(11): 3094-3100.
- [17] MORIARTY D J W. The role of microorganisms in aquaculture ponds[J]. Aquaculture, 1997, 151(1/4): 333-349.
- [18] WU S G, WANG G T, ANGERT E R, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. PloS One, 2012, 7(2): e30440.
- [19] CHENG Y F, ZHOU Q L, XIE J, et al. Microbial community analysis in crab ponds by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(5): 825-831.
- [20] 刘娅琴,邹国燕,宋祥甫,等.框式复合型生态浮床对富营养水体浮游植物群落结构的影响[J].水生生物学报,2010,34(1):196-203.
LIU Y Q, ZOU G Y, SONG X F, et al. Effect of a new ecological floating bed system (EFBS) on phytoplankton community in eutrophicated water [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 196-203.
- [21] 刘娅琴,邹国燕,宋祥甫,等.富营养水体浮游植物群落对新型生态浮床的响应[J].环境科学研究,2011,24(11):1233-1241.
LIU Y Q, ZOU G Y, SONG X F, et al. Response of phytoplankton community to a new ecological floating bed system (EFBS) in enclosures with eutrophicated water [J]. Research of Environmental Sciences, 2011, 24(11): 1233-1241.
- [22] 李艳枫,刘凌,陈宁,等.一种新型的复合生态浮床及其对浮游植物群落结构的影响[J].水资源保护,2014,30(2):46-51.
LI Y F, LIU L, CHEN N, et al. A new type of compound ecological floating bed system and its effect on phytoplankton community structure [J]. Water Resources Protection, 2014, 30(2): 46-51.
- [23] 吴小慧,张丹,黄民生,等.梯级浮床修复黑臭河道过程中浮游植物动态研究[J].华东师范大学学报:自然科学版,2011(1):95-103.
WU X X, ZHANG D, HUANG M S, et al. Dynamic junior monitoring of phytoplankton in the process of malodorous river remediation by staged ecological floating - beds [J]. Journal of East China Normal University: Natural Science, 2011(1): 95-103.
- [24] 张伟.生态浮床对藻类群落结构及N、P的影响[D].南

- 京: 南京农业大学, 2012.
- ZHANG W. Effect of algae population structure and N, P by ecological floating bed [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [25] 赖子尼, 余煜棉, 庞世勋, 等. 鳊鱼养殖池塘水体叶绿素 a 与 16 项生态因子的关系[J]. 中国水产科学, 2004, 11(5): 426 - 431.
- LAI Z N, YU Y M, PANG S X, et al. Correlations of chlorophyll-a concentration and aquatic eco-factors in cultural ponds[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(5): 426 - 431.
- [26] 邢鹏, 孔繁翔, 曹焕生, 等. 太湖浮游细菌与春末浮游藻类群落结构演替的相关分析[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1696 - 1702.
- XING P, KONG F X, CAO H S, et al. Relationship between bacterioplankton and phytoplankton community dynamics during late spring and early summer in Lake Taihu [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(5): 1696 - 1702.
- [27] 姜彩虹, 张美玲, 陶琰洁, 等. 上海市内不同水质的河道春季浮游细菌群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 522 - 527.
- JIANG C H, ZHANG M L, TAO Y J, et al. Bacterial community structure in four different rivers of Shanghai in spring[J]. Microbiology, 2009, 36(4): 522 - 527.
- [28] 于洋, 王晓燕, 张鹏飞. 北运河水体浮游细菌群落的空间分布特征及其与水质的关系[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(3): 337 - 344.
- YU Y, WANG X Y, ZHANG P F. Spatial distribution of planktonic bacterial community and its relationship to water quality in Beiyun River[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(3): 337 - 344.
- [29] 吕明姬, 汪杰, 范铮, 等. 滇池浮游细菌群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系[J]. 环境科学学报, 2011, 31(2): 299 - 306.
- LV M J, WANG J, FAN Z, et al. The spatial variations of bacterioplankton community composition in Lake Dianchi and their relation to environmental factors [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(2): 299 - 306.

Effect of water hyacinth planting on microbial community structures in water of a tilapia cultural pond

FAN Limin^{1,2}, CHEN Jiazhang^{1,2}, WU Wei², MENG Shunlong^{1,2}, SONG Chao², HU Gengdong², QIU Liping², QU Jianhong², XU Pao^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in the Lower Reaches of the Yangtze River, Wuxi 214081, Jiangsu, China)

Abstract: The effect of water hyacinth planting on the microbial community in water of a tilapia cultural pond was investigated with the method of high throughput sequencing. The differences of microbial communities' structure, of bacterial communities' diversity, and of bacterial communities' richness between the water hyacinth planting area and the open water area were analyzed. And the relationships between some of the environmental parameters and community diversity and richness of planktonic bacteria were analyzed to state some possible mechanism of the effect. The results are as follows: (1) The phyla of Cyanobacteria, Actinobacteria and Proteobacteria were the dominant bacteria in pond water. (2) The planting of water hyacinth reduced the abundance of Cyanobacteria, and the diversity and richness of whole bacterial community in the vicinity of the floating beds, at the same time, increased the abundance of the other important phyla except the Cyanobacteria phylum in the same locations. (3) The concentrations of chlorophyll a and nitrite were negatively correlated with the diversity and richness of microbial community. It might mainly be caused by the planting of water hyacinth.

Key words: high throughput sequencing; tilapia; intensive pond; planktonic bacteria; water hyacinth